



Identificación de *Chlamydophila psittaci* en aves psitácidas del hogar de paso de fauna silvestre “La María”, Pereira.

Por:
Sebastián Rivera Osorio

Cód. 1088020144

Asesores:
Santiago Monsalve Buriticá, MVZ, M.Sc, Dr.Sc (c)
María Fernanda Londoño López, MV, M.Sc

**Universidad Tecnológica de Pereira
Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Facultad de Ciencias de La Salud
Pereira- Risaralda
2018**

Tabla de Contenido

“Identificación de *Chlamydophila psittaci* en aves psitácidas del hogar de paso de fauna silvestre “La María”, Pereira.”.

Resumen.....	5
1. Introducción.....	7
1.1. Reacción en cadena de la polimerasa.....	12
1.2. Electroforesis.....	13
2. Objetivo General.....	13
2.1. Objetivos específicos.....	13
3. Materiales y métodos.....	14
3.1. Área geográfica.....	14
3.2. Población y toma de muestras.....	14
3.3. Transporte.....	14
3.4. Reacción en cadena de la polimerasa.....	15
3.5. Electroforesis.....	17
4. Resultados y discusión.....	19
4.1. Resultados.....	19
4.2. Discusión.....	21
5. Conclusiones.....	22
6. Agradecimientos.....	23
7. Referencias Bibliográficas.....	23

Identificación de *Chlamydophila psittaci* en aves psitácidas del hogar de paso de fauna silvestre “La María”, Pereira.

Identification of *Chlamydophila psittaci* in psittacine birds of the home of wildlife passage "La María", Pereira.

Sebastián Rivera Osorio ^a, Santiago Monsalve Buriticá ^b, María Fernanda Londoño ^c

^a Médico Veterinario y Zootecnista en formación de la Universidad tecnológica de Pereira, ^b Médico Veterinario y Zootecnista, M.Sc, Dr.Sc (c) docente de microbiología y medicina de fauna de la Corporación Universitaria Lasallista

^c Médico Veterinario, especialista en laboratorio clínico veterinario, docente de microbiología y parasitología de la Universidad Tecnológica de Pereira,

Resumen

Las psitácidas son una familia de aves de características morfológicas específicas, que abarcan un gran número de especies distribuidas en su mayor parte en América; la psitacosis es una enfermedad infectocontagiosa que este tipo de aves padecen, es zoonótica, y su sintomatología es bastante silenciosa generando signos clínicos similares a los de un resfriado común o tan graves como los de una neumonía, puede llegar a ser mortal si no se trata. Es causada por *Chlamydophila psittaci* una bacteria intracelular que afecta tanto aves como mamíferos, ocasionando graves síntomas y un gran problema de morbilidad tanto en animales como en humanos, para controlar esta enfermedad es necesario conocer el número de individuos afectados en el lugar de estudio, para así tratarla y minimizar su incidencia; con este trabajo se evaluó la frecuencia de psitacosis en el hogar de paso “La María” propiedad de la CARDER, sitio donde se albergan un número significativo de estas aves producto del decomiso generado por el tráfico ilegal en Risaralda, se tomaron muestras sanguíneas por venopunción directa extraídas de la vena braquial, de una población de aves

psitaciformes del genero *Ara spp* y *Amazonas spp*, posterior a la toma de muestras se hace el diagnóstico por medio de PCR (reacción en cadena de la polimerasa), obteniendo un producto final que será procesado por medio de electroforesis para confirmar la presencia del microorganismo en la secuencia del ADN.

Palabras claves: *Chlamydophila psittaci*, *Clamidiosis aviar*, *Fiebre del loro*, *Ornitosis*, *Papagayos*, *PCR*, *Gen ompA*.

Abstract:

Psittacids are a family of birds with specific morphological characteristics, which cover a large number of species distributed mostly in America; Psittacosis is an infectious disease that this type of birds suffer, is zoonotic, and its symptomatology is quite silent generating clinical signs similar to those of a common cold or as serious as those of a pneumonia, can become deadly if not treated . It is caused by *Chlamydophila psittaci* an intracellular bacterium that affects both birds and mammals, causing serious symptoms and a major morbidity problem in both animals and humans, to control this disease it is necessary to know the number of individuals affected in the study site, to Thus treating it and minimizing its incidence; This work was evaluated the frequency of psittacosis in the home of passage "La María" owned by CARDER, a site where a significant number of these birds are the product of the seizure generated by illegal traffic in Risaralda, taking blood samples by venipuncture Direct extraction from the brachial vein of a population of psitaciform birds of the genus *Ara spp* and *Amazonas spp*, after the samples are taken, the diagnosis is made by means of PCR (polymerase chain reaction), obtaining a final product that was processed by means of electrophoresis to confirm the presence of the microorganism in the DNA sequence.

Keywords: *Chlamydophila psittaci*, *Avian chlamydiosis*, *Parrot fever*, *Ornithosis*, *Parrots*, *PCR*, *Gen ompA*.

1. Introducción

La psitacosis es una enfermedad infectocontagiosa de importancia en la salud tanto humana como animal (1,2), la presencia del microorganismo en nuestro país es desconocido en las poblaciones humanas. Es una enfermedad zoonótica y subclínica (3), generando síntomas similares a los causados por otros agentes etiológicos, puede llegar a ser mortal si no se trata adecuadamente (4); la enfermedad es causada por *Chlamydophila psittaci* una bacteria intracelular obligada la cual se puede encontrar en el excremento seco de las aves, en secreciones oculares y respiratorias, y en partículas procedentes de las plumas(5,6).

Este microorganismo circula en organismos macro vertebrados de la clase ave y mamífera (7), uno de los problemas que existen en Latinoamérica y Colombia corresponde al tráfico de fauna, los ejemplares de clase ave, del orden psitaciforme y del genero Amazona y Ara son los individuos más apetecidos para tenencia ilegal debido al carisma y vistosidad de estas especies; Ha sido reportada en trabajadores de zoológicos, en médicos veterinarios, personas dedicadas al comercio, atención y valoración de este tipo de aves, la detección de *Chlamydophila psittaci*, convirtiendo la enfermedad en un problema de salud pública ocupacional (8,9).

En las aves las causas de morbilidad están directamente relacionadas con el entorno; existen factores en este tipo de aves que predisponen a la maximización del contagio causado en condiciones ex situ, por el estrés ocasionado por el tráfico ilegal y el confinamiento (6). Para crear una línea base del conocimiento de esta enfermedad en Risaralda, propender por el bienestar humano y la biodiversidad colombiana, se hace necesario ahondar en estudios y adaptar protocolos de detección molecular de microorganismos con el fin de dar un diagnóstico de la circulación de la enfermedad (9); con este trabajo se pretende detectar la frecuencia de *Chlamydophila psittaci* en los géneros Amazona spp. y Ara spp. del hogar de paso de fauna silvestre “La María”, Pereira.

La psitacosis afecta aves silvestres y domésticas, humanos y otros mamíferos, se ubica principalmente en regiones tropicales y subtropicales; es causada por la bacteria *Chlamydophila psittaci*, encontrada en el excremento seco de las aves, en secreciones oculares y respiratorias, y en partículas procedentes de las plumas; uno de los principales problemas es la tenencia de psitácidos exóticos en cautiverio como lo son las especies *Melopsittacus undulatus*, *Ara spp*, *Amazona spp*, estos tienen contacto directo con el humano y libertad de desplazamiento por el hogar, dejando sus deposiciones, plumas y secreciones por diferentes lugares, logrando que la predisposición a la enfermedad sea mayor. Las aves que están en constante cercanía con el ser humano y otros mamíferos, ocasionan peligros en la salud pública, siendo este el caso de los albergues, refugios animales, zoológicos, tiendas de mascotas, los médicos veterinarios y demás personas encargadas, tienen un contacto directo con las secreciones y las deposiciones predisponiendo a adquirir la enfermedad fácilmente.

Actualmente existe poca información en Colombia sobre la prevalencia de esta enfermedad que cuenta con un gran potencial zoonótico, por lo tanto, es importante ahondar en la investigación y elaboración de protocolos de detección molecular que permita contar con un adecuado estado del arte.

La necesidad de este estudio en particular, surge de la inexistencia de información sobre la epidemiología en la ciudad, el desconocimiento de la enfermedad y su sintomatología.

La psitacosis es causada por una bacteria Gram negativa intracelular obligada que tiene un tamaño medio de 0.5 μm , esta se encuentra dentro del huésped como un cuerpo elemental que es la forma inefectiva y sobrevive en el medio externo, su diseminación principal es mediante la inhalación, la bacteria viaja desde el ave infectada hasta el pulmón de un organismo no infectado, allí es capturado por fagocitos dentro de una estructura llamada endosoma (10). No se destruye por fusión con lisosomas, sino que se transforma en un cuerpo reticulado que es la forma no infecciosa, metabólicamente activa y que se multiplica usando otras células del huésped (11).

Luego, nuevamente se transforman en cuerpos elementales y regresan al pulmón después de ocasionar la muerte de la célula huésped. Desde este momento, tienen la capacidad de infectar nuevas células, ya sea en el mismo organismo o en un nuevo huésped. El ciclo vital de *Chlamydophila psittaci* se divide entre el cuerpo elemental, que infecta a nuevos huéspedes, pero que no puede multiplicarse, y el cuerpo reticular, que se multiplica, pero que no puede causar nuevas infecciones (8,12).

Esta bacteria afecta aves domésticas, aves silvestres, y algunos mamíferos como también a los humanos (1,6), pertenece a la familia *Chlamydiaceae* se divide en dos géneros: *Chlamydia* y *Chlamydophila*; la *Chlamydia* está presente en especies de mamíferos que pueden o no contraerla de las aves, la Clamidiosis puede ser causada por diferentes microorganismos, o si es adquirida de las aves esta es llamada Clamidiosis aviar (13,14); mientras que el género *Chlamydophila* incluye más de 15 genotipos, muchos de ellos relacionados con las aves y los mamíferos; al ser adquirida de aves silvestres, domésticas o que se presenta en ellas, la enfermedad se llama ornitosis (13) y si la enfermedad afecta específicamente a las aves psitácidas es llamada psitacosis (15,16).

Chlamydophila psittaci comprende ocho serovares, el serovar A es endémico entre las aves psitácidas y ha causado enfermedad en mamíferos, tortugas y esporádicamente en el hombre, el serovar B es endémico entre las palomas, se ha aislado de pavos y también se ha identificado como causa de aborto en ganado lechero (17,18), los serovares C y D son de riesgo ocupacional para trabajadores de mataderos y personas que están en contacto con aves, los aislados del serovar E se han obtenido de una variedad de huéspedes humanos y aviares distribuidos en todo el mundo, los otros serovares [F, WC, M56] corresponden a cepas aisladas durante brotes en mamíferos como caballos, ovinos, cérvidos, gatos, perros y cobayos (19).

La psitacosis afecta sobre todo a las aves psitácidas que comúnmente se conocen como loros o papagayos, esta familia de aves son aquellas que se caracterizan por tener su pico curvado y ser buenas voladoras, escaladoras, y sujetar el alimento con sus patas para llevarlo al pico. Existen 328 especies de

esta familia y en Colombia encontramos 51 especies distribuidas en los diferentes climas (20).

La virulencia hacia el humano, es más alta en aves encontradas en cautiverio, que en las aves que están en su hábitat natural, ya que las infectadas liberan la bacteria por medio de heces, orina, partículas procedentes de las plumas y secreciones oculares y nasales; el humano se infecta gracias a la gran dispersión que tiene este microorganismo, la infección se da por estar en contacto directo con individuos infectados o por medio de corrientes de aire que conllevan a la inhalación del microorganismo (8,9,21).

La bacteria en las aves es transmitida por contacto directo de secreciones infectantes, inhalación de partículas, consumo de alimento y agua contaminada, se han reportado casos de transmisión vertical, y con mayor frecuencia las aves jóvenes se infectan en el nido o por las secreciones provenientes del alimento regurgitado de los padres (3) ; la infección puede ser asintomática u ocasionar signos clínicos graves, principalmente afectando el tracto respiratorio y el intestinal (9), cuando las aves silvestres son capturadas y sometidas al comercio ilegal estas se transportan y se retienen en hacinamiento, suciedad, falta de alimento y agua, todos estos componentes y el cambio de hábitat y temperatura influyen produciendo estrés, condición que en muchos casos conlleva a la muerte; aquellas que sobreviven cursan un periodo de inmunodepresión , siendo este uno de los principales desencadenantes de los signos clínicos que en pocas aves se evidencian haciendo difícil su diagnóstico clínico (16,18), estos son disnea, secreciones oculares/nasales, plumaje erizado, letargia, diarrea verde-grisácea, emaciación, hipertermia, anorexia; y en enfermedad severa son conjuntivitis, sinusitis, neumonía y muerte hasta signos neurológicos como temblores o parálisis (7,22,23). En animales muertos a la necropsia se evidencia aumento del bazo e hígado, inflamación fibrinosa de los sacos aéreos con secreciones purulentas, pericarditis y peritonitis (15).

En humanos los signos clínicos característicos son muy similares a los de un resfriado común y con fiebre alta, cefalea, escalofríos, tos seca, esputos con sangre, fatiga, dolores articulares y musculares, sonidos pulmonares anormales,

como estertores; y en enfermedad severa son endocarditis, neumonía, encefalitis y/o finalmente muerte (2).

El periodo de incubación de la enfermedad en humanos está entre 1 a 4 semanas y en aves de 3 días a varias semanas (22).

En el diagnóstico clínico se han reportado dificultades a la detección del microorganismo por medio de la microscopia óptica, por lo tanto han sido consideradas útiles las técnicas moleculares en este proceso, las muestras se recogen de forma aséptica y según los signos que se estén manifestando en el individuo. En los casos de curso de la enfermedad aguda, se toman muestras de exudados y de secreciones oculares y nasales. En casos con diarrea donde la enfermedad está más avanzada, se toman muestras de la materia fecal y se hace frotis cloacal e hisopados faríngeos, oculares y/o nasales(13).

Para su diagnóstico es necesario realizar un diferencial principalmente con enfermedades de curso similar como *Salmonelosis* en los casos de cuadros digestivos y nerviosos, *Mycoplasmas* en conjuntivitis y problemas respiratorios, y como en infecciones bacterianas por *Legionella*, *Coxiella burnetii*, *Bordetella bronchiseptica*, por etiologías víricas como el virus de la *Influenza*, *Herpesvirus*, infestaciones parasitarias como *Cryptosporidium*, o fúngicas como *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* (9) , entre otras.

Para confirmar la presencia de *Chlamydophila psittaci* en aves se realiza una (PCR - reacción en cadena de la polimerasa), esta es una reacción enzimática que amplifica una secuencia específica del ADN en donde una secuencia blanco es replicada repetidamente (24); logrando con esto que en la secuencia amplificada de ADN se pueda detectar la presencia de la bacteria. Los elementos requeridos en el momento de realizar la reacción son el templado o molde (ADN), la enzima, los oligonucleótidos o cebadores (primer's), los desoxirribonucleótidos trifosfatados (adenina, guanina, citosina, timina), el ión (magnesio), una solución amortiguadora o buffer y agua ultra pura, para actuar en 3 etapas principales realizadas en la PCR que son desnaturalización, alineamiento y extensión (24–28).

1.1 Reacción en cadena de la polimerasa

También llamada PCR por sus siglas en inglés (polymerase chain reaction), es un método in vitro en el que ocurre una reacción enzimática donde se amplifica un fragmento específico del ADN (ácido desoxirribonucleico) y es copiado y replicado exponencialmente, su utilidad es que al ser amplificada una secuencia, es mayor la probabilidad de identificación de los agentes causantes de enfermedades (24,29).

La PCR consta de 3 etapas esenciales: desnaturalización, alineamiento y extensión, cada una de estas se compone de unas características importantes que se deben cumplir a cabalidad para lograr con precisión el resultado.

La desnaturalización es aquella fase en donde las cadenas de ADN de doble hélice se separan, dejando una cadena sencilla de bases nitrogenadas que serán emparejadas con oligonucleótidos cebadores, para realizar este proceso es importante contar con una temperatura de 98°C y un tiempo de por lo menos 1 minuto, crítico para realizar una completa separación, dejando cadenas sencillas listas para el siguiente paso.(28,30)

El alineamiento o hibridación es la segunda fase, donde se incluyen los 2 cebadores o primers, la temperatura desciende y se fija entre 40 - 65°C permitiendo que estos se unan a su secuencia complementaria de la cadena sencilla del paso anterior.(26)

La última fase llamada extensión o elongación es una etapa en la que se incluye la enzima Taq polimerasa (*Thermus aquaticus*) esta tiene su actividad máxima a una alta temperatura: 72°C, con el fin de evitar alineamientos inespecíficos. En esta temperatura la enzima extiende los cebadores y de esta forma sintetiza nuevas cadenas de ADN, el proceso inicia a partir del extremo 3' de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de ADN molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble (30). Estas tres fases se repiten alrededor de 30 veces, duplicándose en cada fase el número de cadenas determinadas por los oligonucleótidos (28). Es realizado en Programa termociclador Rotor Gene.

1.2 Electroforesis

Para conocer si se presenta o no este microorganismo en el producto final de la PCR se realiza electroforesis en gel de agarosa al 2%, esta técnica es utilizada para separar fragmentos de ADN (u otras macromoléculas, como ARN y proteínas) por su tamaño y carga, basado en esto, las moléculas se desplazarán por el gel en diferentes direcciones o a distintas velocidades, con lo que se separan unas de otras (31).

Las muestras de ADN se cargan en pozos en un extremo del gel y se aplica corriente eléctrica para arrastrarlas a través del mismo, uno de los pozos es exclusivo para el marcador de peso molecular (MPM) un estándar de referencia que contiene fragmentos de ADN de longitudes conocidas, los fragmentos de ADN tienen carga negativa debido a los grupos fosfato de su esqueleto de azúcares-fosfato, por lo que se mueven hacia el polo positivo; los fragmentos de ADN más cortos atraviesan más rápido a través del gel y estarán en tiempo corto más cerca del extremo positivo (30,32).

2. Objetivos

Detectar la presencia de *Chlamydophila psittaci* en los géneros Amazona spp. y Ara spp. del hogar de paso de fauna silvestre “La María”, Pereira, por medio de técnica molecular.

2.1 Objetivos específicos

- Establecer el protocolo óptimo de PCR para la detección molecular y diagnóstico de la bacteria *Chlamydophila psittaci* presente en el ADN de aves de la familia psittacidae.
- Realizar la amplificación del gen ompA de un control positivo de *Chlamydophila psittaci*

3. Materiales y métodos

3.1 Área geográfica

Los animales de los que se obtienen las muestras se ubican en el hogar paso “La María” propiedad de la CARDER, este se encuentra en un área protegida de la cuenca del río Otún en la vereda la María /Corregimiento la Florida, que se ubica en el sector nor-oriental del municipio de Pereira tiene una altura entre 900 y 3.600 m.s.n.m., una temperatura media anual de 21°C, una precipitación de 2.108 mm/año y una humedad relativa promedio de 79% (33).

3.2 Población y Toma de muestras

Los ejemplares utilizados para este estudio son psitácidas que comprenden los géneros de *Amazona* y *Ara* (loras y guacamayas), entre las que encontramos diferentes especies: *Amazona Ochrocephala*, *Amazónica*, *Autumnalis* y *Ara Severus*, *Macao*, *Ararauna*, *Chloroptera*. Las muestras se toman de 71 de las aves psitácidas del lugar, realizando toma de muestras sanguíneas de la vena radial (alar) con jeringas estériles de 3ml, aguja 23G / 26G, y tubos microtainer tapa lila con anticoagulante EDTA, el tamaño de la muestra fue de centímetro y medio; en algunas aves donde se complicó la toma de muestra, se realizó con un mínimo de 200 micro litros.

3.3 Transporte

Para el transporte de las muestras de campo se usó una cava de icopor con pilas de refrigeración, las muestras se refrigeraron durante el transporte a 4°C, para tratar de conservar su viabilidad, este no sobrepasó las 24 horas para su llegada al laboratorio (9). Luego de la toma de estas muestras en el hogar de paso, se transportaron al laboratorio clínico de la Corporación Universitaria Lasallista ubicada en Caldas-Antioquia, donde fueron procesadas para realizar un PCR convencional o también conocida como punto final.

3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa – PCR

Tabla 1. Reactivos y muestras

REACTIVO	VOLUMEN (µl) micro-litros por reacción
Agua ultra pura	11.7
Buffer	4
DMSO	0.6
dNTPs	0.5
Iniciador cpsitF (1)	0.5
Iniciador cpsitR (1)	0.5
Taq	0.2
ADN	2
Total	20 µl

Reactivos y muestras en la Tabla 1: El agua ultra pura es importante para realizar la dilución, el buffer tiene una serie de componentes entre estos el magnesio lo que realiza es regular el pH, el DMSO hace que haya un acople entre todos los componentes con el ADN, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (Adenina, Guanina, Citosina, Timina), los primer's forward y reverse, la Taq polimerasa (Thermus aquaticus) enzima importante que ayuda en la síntesis del ADN, y el ADN es el control positivo.

Métodos

Secuencia de los iniciadores-primer's o cebadores:

-Primer 1 → primer forward: **CpsitF**: 5'-GCAAGACACTCCTCAAAGCC-3'

-Primer 2 → primer reverse: **CpsitR**: 5'-CCTTCCCACATAGTGCCATC-3'

Tabla 2. Condiciones ideales para la PCR

Paso	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	98°C	30 segundos	1
Desnaturalización	98°C	10 segundos	35
Alineamiento	60°C	15 segundos	
Extensión	72°C	20 segundos	
Extensión final	72°C	8 minutos	1
Tamaño del amplicón: <u>264 pb</u>		TOTAL: 1hr 30min	

Tabla 3. Equipos e instrumental

EQUIPO	CAPACIDAD	CANTIDAD
Cabina de bioseguridad Pre-PCR y PCR	-	1
Vortex	-	1
Centrifuga	11.000 rfc	1
Congelador	-20°C	1
Micropipeta	100-1000ul	1
Micropipeta	20-200ul	1
Puntas para micropipetas	100 a 1000ul, 20 a 200ul, 10ul	100
Tubos eppendorf	1,5 ml	10

Procedimiento

1. Calcular las cantidades de los reactivos con base en la tabla 3, en donde se muestran las cantidades recomendadas para un volumen de reacción de 20 µl. Calcular el volumen total según el número de muestras más uno.

2. Dentro del cuarto de Mix: limpiar adecuadamente la cámara de pre-PCR utilizando alcohol, y colocar el material necesario dentro de esta. Precaución: el ADN nunca debe ingresar a esta cámara. Dejar irradiar con luz UV por 15 minutos antes y después de trabajar.
3. Colocar las cantidades requeridas de cada reactivo en un tubo de 1,5 ml. Recuerde mezclar bien cada reactivo antes de tomar la cantidad deseada, y mantener todos los reactivos en hielo.
4. Mezclar la solución de reacción por Vórtex y colocar 18 µl de esta mezcla en cada tubo de 0,2 ml debidamente rotulado. Recuerde mantener los tubos en hielo (O en cooler).
5. Retirarse de la cámara y llevar los tubos a la cabina destinada para colocar el ADN.
6. Colocar 2 µl de ADN en el tubo respectivo.
7. Colocar los tubos en el termociclador y encender el programa adecuado
8. No olvidar limpiar nuevamente la cámara de flujo, e irradiar con luz UV después de acabar el trabajo.
9. Una vez terminado el programa, retirar los tubos del termociclador y realizar la electroforesis, de no ser posible, almacenarlos a -20°C hasta su procesamiento.

3.5 Electroforesis

Para realizar esta técnica se requiere cámara de electroforesis SUB-CELL® GT, BIO-RAD. En gel de agarosa al 2%, En cada pozo se depositan 5µl del producto final de la PCR diluidos en 3µl de tinción EZ visión, se utilizaron 3µl del marcador de peso molecular de 100pb. Los geles se visualizan mediante una foto documentadora, para tomar evidencia fotográfica. Una banda de 264pb indica la presencia del microorganismo en un individuo infectado.

Protocolo de electroforesis

Gel de agarosa

1. 40ml de TBE (Tampón formada por Tris, Borato y EDTA)
2. Adicionar 0,8 gramos de agarosa para que quede al 2%
3. Mezclar suavemente
4. Llevar al horno microondas por 1 minuto
luego de 30 segundos stop, mezclar y reinicio
faltando 19 segundos stop y mezclar
5. Reposar 3 minutos, adicionar 4µl de EZvision y mezclar otros 4 minutos en reposo
6. Preparar la cámara con el peine y depositar pasados 7 minutos desde que se saca el gel del microondas, lentamente para evitar presencia de burbujas
7. Se deja hasta que solidifique el gel por 20 minutos

Electroforesis

1. Montar la cámara de electroforesis sin encender
2. Retirar el peine de gel ya solidificado y depositar el gel en la cámara
3. Depositar 500ml de TBE que actúa como buffer de corrida en la cámara
4. Preparar las muestras
5. Con papel Para-film adicionar 1ml de buffer de carga (6x) (por muestra o por MPM) sin embargo OJO que la enzima Taq polimerasa fusión de thermo ya la trae y no hay necesidad de usarlo
6. Mezclar 3µl de MPM (por gel) en 1µl del buffer de carga y se depositan en el primer pozo del gel de agarosa
7. Mezclar 5µl de la muestra en 1µl del buffer de carga (6x) excepto muestras que se obtengan con Taq polimerasa fusión thermo
Pasar pipeta de 3,1µl a 4,1µl en MPM + Buffer de carga 6x
Pasar pipeta de 5,1µl a 6,1µl en muestras + buffer de carga 6x

8. Luego de montar las muestras tapar la cámara, conectar y encender a 100 voltios por 45 minutos
9. Apagar la cámara
10. Sacar el gel y llevarlo a la foto documentadora.

4. Resultados y discusión

4.1 Resultados

Programas informáticos: Para la confirmación de las secuencias y las amplificaciones se requiere de programas bioinformáticos que sustenten tal información, para esto se utilizaron programas como BLAST y primer BLAST de NCBI.

Los primer's utilizados se obtuvieron a partir de estudios previos realizados por Hewinson, R G y colaboradores (34). Esta secuencia fue confirmada en primer BLAST, arrojando una confiabilidad que los primer's utilizados son adecuados para *Chlamydomophila psittaci*.

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCAAGACACTCCTCAAAGCC	20	59.12	55.00	2.00	1.00
Reverse primer	CCTTCCCACATAGTGCCATC	20	58.03	55.00	4.00	1.00

Products on target templates

>AB284066.1 Chlamydomophila psittaci ompA gene for major outer membrane protein, major outer membrane protein, complete cds, strain: Borg (= ATCC VR-601)

product length = 264

Forward primer 1: GCAAGACACTCCTCAAAGCC 20
 Template 113 132

Reverse primer 1: CCTTCCCACATAGTGCCATC 20
 Template 376 357

Tabla 4: Secuencia de los primer analizados por el programa bioinformatico PrimerBLAST- NCBI

Por medio de la técnica PCR con el protocolo de la tabla 2. Se obtuvo amplicón de un segmento del gen ompA, que posteriormente fue confirmado por medio de la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 2%. En la electroforesis se realizó un ensayo de gradientes con las siguientes muestras: (Control positivo) carril 1, (Loro 11) carril 2, (Loro 22) carril 3, control negativo externo (out) carril 4. MPM marcador de peso molecular de 100 PB. Los resultados demuestran la amplificación de un segmento del gen ompA a una temperatura de 53°C en el alineamiento del ciclaje (Tabla 5).



Tabla 5. Electroforesis en gel de agarosa al 2 % de amplicón obtenido por medio de técnica de PCR.

Posterior a la confirmación de electroforesis se envió el amplicón a secuenciación en Macrogen Corea©, donde se reportó la siguiente secuencia:

```
5' A CAG GAT ATC TTG TCT GGC TTT AAC TTG GAC GTG GTG CCG CCA GAA GAG CAA ATT
AGA ATA GCG AGC ACA AAA AGA AAA GAT ACT AAG CAT AAT CTT TAG AGG TGA GTA TGA
AAA AAC TCT TGA AAT CGG CAT TAT TGT TTG CCG CTA CGG GTT CCG CTC TCT CCT TAC
AAG CCT TGC CTG TAG GGA ACC CAG CTG AAC CAA GTT TAT TAA TCG ATG GCA CTA TGT
GGGAAG G 3'
```

Esta secuencia posteriormente fue confirmada por medio del programa BLAST el cual arroja un resultado de identidad del 100% a *Chlamydomonas reinhardtii* (Tabla 6)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
Chlamydomonas reinhardtii ompA gene for major outer membrane protein, major outer membrane protein, complete cds, strain	431	431	100%	5e-117	100%
Chlamydomonas reinhardtii ompA gene for major outer membrane protein, major outer membrane protein, complete cds, strain	431	431	100%	5e-117	100%
Chlamydomonas reinhardtii ompA gene for major outer membrane protein, major outer membrane protein, complete cds, strain	431	431	100%	5e-117	100%
Chlamydomonas reinhardtii ompA gene for major outer membrane protein, major outer membrane protein, complete cds, strain	431	431	100%	5e-117	100%
Chlamydomonas reinhardtii ompA gene for major outer membrane protein, major outer membrane protein, complete cds, strain	431	431	100%	5e-117	100%
Chlamydomonas reinhardtii ompA gene for major outer membrane protein, major outer membrane protein, complete cds, strain	431	431	100%	5e-117	100%

Tabla 6: Secuencia analizada por programa bioinformático BLAST-NCBI

Chlamydomonas reinhardtii ompA gene for major outer membrane protein, major outer membrane protein, complete cds, strain: Borg (= ATCC VR-801)
Sequence ID: [AB224206.1](#) Length: 1460 Number of Matches: 1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
431 bits(233)	5e-117	233/233(100%)	0/233(0%)	Plus/Plus

Range 1: 144 to 376 [Graphics](#)

Query	1	ACAGATATCTTCTCTGCTTTAACTTGGAGTGGTCCGCCAGAGAGCAATAGAAAT	68
Subject	144	ACAGATATCTTCTCTGCTTTAACTTGGAGTGGTCCGCCAGAGAGCAATAGAAAT	203
Query	61	ACGAGACACAAAAGAAAGATACTAAGCATAATCTTTAGAGTGAGTATGAAAAATC	120
Subject	204	ACGAGACACAAAAGAAAGATACTAAGCATAATCTTTAGAGTGAGTATGAAAAATC	263
Query	121	TTGAATCGGCAATTATTGTTGCCGCTACGGGTCCGCTCTCTCTTACAGCTTTGCT	180
Subject	264	TTGAATCGGCAATTATTGTTGCCGCTACGGGTCCGCTCTCTCTTACAGCTTTGCT	323
Query	181	GTAGGGAACCCAGCTGACCAAGTTTATTATGATGACACTATGTGGGAGG	239
Subject	324	GTAGGGAACCCAGCTGACCAAGTTTATTATGATGACACTATGTGGGAGG	378

Tabla 7: Secuencia analizada por programa bioinformático BLAST-NCBI

4.2 Discusión:

La secuencia de los primer's diseñados son confirmados por medio de primer-BLAST-NCBI (Tabla 4) arrojando una confiabilidad que los primer's utilizados fueron adecuados para *Chlamydomonas reinhardtii* y una autocomplementariedad relativamente baja.

En el momento de la verificación de los segmentos amplificados se presentó una banda a nivel de 264pb lo que corresponde al gen ompA el cual es un gen de membrana externa que desempeña un papel importante en la patogenicidad, tiene funciones de adhesina y porina, participando en la adhesión e invasión posterior de células no fagocíticas y en la generación de respuestas inmunes humorales de protección, la amplificación de este gen además de ayudarnos a verificar la identificación taxonómica por medio de un análisis filogenético, nos ayuda a descartar la presencia de inhibidores de la PCR en las muestras de ADN

extraídas; puede ser considerado un gen variable ya que ha presentado en diferentes especies aproximadamente cuatro dominios de variabilidad (35).

Para la confirmación de las secuencias amplificadas por MacroGen Corea© se utiliza el programa informático de alineamiento de secuencias: BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) – NCBI (Tabla 7) indicando que el gen pertenece al género *Chlamydophila* con una identidad del 100% a *Chlamydophila psittaci*, y un E-value de 5 en 58 mil millones según estos valores que se obtienen quiere decir que es muy improbable que no sea *Chlamydophila psittaci*; lo que lleva a confirmar que se detectó la presencia del patógeno en el ave identificado con el número 22 (Identificación: 956001700018644) perteneciente al género *Amazona ochrocephala* del refugio de fauna silvestre “la María” en Pereira. Teniendo en cuenta que se amplificó un gen del patógeno objetivo, se puede determinar que el protocolo fue adecuado para este microorganismo; también se deben realizar futuros ajustes puesto que este gen es variable se requiere optimizar sensibilidad y especificidad, este puede presentar 4 regiones variables lo que posteriormente puede ser útil para realizar un análisis más a fondo de filogenética o un análisis de origen.

5. Conclusiones

La *Chlamydophila psittaci* es un patógeno que genera alta morbilidad y se presenta de manera silenciosa, por medio de las técnicas moleculares se pueden detectar más específicamente los genes de este tipo de patógenos; Al obtener un resultado positivo del gen *ompA* en este individuo se recomienda realizar un estudio más a fondo con la totalidad de las aves del lugar, para así descartar posibles errores en la toma de muestras y confirmar si hay presencia de más de un ave infectada y la prevalencia que se puede presentar allí, además que este trabajo puede ser el inicio para análisis posteriores a la presentación de *Chlamydophila psittaci* a nivel nacional.

6. Agradecimientos

Agradezco infinitamente a mis padres por todo su amor, acompañamiento, dedicación y apoyo incondicional, A los profesionales del hogar de paso de fauna silvestre “La María” en Pereira por su acompañamiento y colaboración en la toma de muestras, a mis asesores que con paciencia resolvieron mis dudas y me transmitieron su conocimiento, El doctor Santiago Monsalve por tantas cosas, entre esas financiar los implementos para la realización del proyecto y procesar las muestras en el laboratorio clínico de la Corporación Universitaria Lasallista con el acompañamiento de la estudiante Azucena Cabrera quien se encargó de realizar diferentes ensayos, a la Dra. Lorena Jaramillo –Universidad CES por proporcionar el control positivo y a todas aquellas personas que contribuyeron y colaboraron para la realización del mismo.

7. Bibliografía

1. Cadario ME, Frutos MC, Arias MB, Origlia JA, Zelaya V, Madariaga MJ, et al. Características epidemiológicas y moleculares de *Chlamydia psittaci* provenientes de 8 casos humanos de psitacosis y de 4 aves relacionadas en la Argentina. Rev Argent Microbiol [Internet]. Elsevier España, S.L.U.; 2017;49(4):323–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2017.04.001>
2. Rodolakis A, Yousef Mohamad K. Zoonotic potential of *Chlamydia*. Vol. 140, Veterinary Microbiology. 2010. p. 382–91.
3. The center for food security and public health; Institute for international cooperation in animal biologics. Clamidiosis Aviar. Vol. Capitulo 2, clamidiosis aviar. 2009; 2009. p. 1–7.
4. Chan J, Doyle B, Branley J, Sheppeard V, Gabor M, Viney K, et al. An outbreak of psittacosis at a veterinary school demonstrating a novel source of infection. One Heal [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;3:29–33. Available

from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.02.003>

5. Vasconcelos TCB de, Nogueira DM, Pereira VL de A, Nascimento ER do, Bruno SF. *Chlamydia psittaci* in captive blue-and-gold macaws (*Ara ararauna*) in a triage center of wild animals in Brazil. *Rev Bras Ciência Veterinária* [Internet]. 2016;23(1–2):37–41. Available from: <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/rbcv.2016.027>
6. Francisco Cuello Gijón. *Psitacosis / Ornitosis*. 2000;1–24.
7. The center for food security and public health; Institute for international cooperation in animal biologics. *Psitacosis / Clamidiosis aviar* [Internet]. 2009. p. 1–8. Available from: <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/psittacosis.pdf>
8. Rodriguez-Dominguez M, Sanbonmatsu S, Salinas J, Alonso R, Gutierrez J, Galan JC. Diagnostico microbiologico de las infecciones por *Chlamydia* spp. y especies relacionadas. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014;32(6):380–5.
9. Alonso R, Galán JC, Fernández JG, Rodríguez-Domínguez M, Salinas J, Gámez SS. *Procedimientos de microbiología clínica*. 2012;
10. Martínez J a P, Storz J. *Genero Chlamydia : Biología Básica Propiedades Antigénicas y Potencial Patogenico*. *Cienc Vet*. 1997;37–49.
11. Stewardson AJ, Grayson ML. *Psittacosis*. *Infect Dis Clin North Am* [Internet]. 2010;24(1):7–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171542>
12. Madigan M. *Brock biology of microorganism*. Upper Saddle River New Jersey: Prentice-Hall; 2003.
13. *Animal. AM de D de la O mundial de la sanidad. Clamidiosis aviar capitulo*

2.3.1. 2012. p. 469–82.

14. Billington S. Clinical and zoonotic aspects of psittacosis. In Pract. 2005;27(5):256–63.
15. OIE. Clamidiosis Aviar capítulo 2.7.4. Vol. Capítulo 2, Manual de la OIE sobre animales terrestres. 2004. p. 920–33.
16. Smith K, Bradley K, Stobierski M, Tengelsen L. Compendium of measures to control *Chlamydophila psittaci* (formerly *Chlamydia psittaci*) infection among humans (psittacosis) and pet birds. J Am Vet Med Assoc. 2005;226:532–9.
17. Andersen AA. Two new serovars of *Chlamydia psittaci* from North American birds. J Vet Diagnostic Investig. 1997;9(2):159–64.
18. Andersen AA, Tappe JP. Genetic, immunologic, and pathologic characterization of avian chlamydial strains. J Am Vet Med Assoc [Internet]. 1989 Dec 1 [cited 2016 Apr 4];195(11):1512–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2689404>
19. Everett KD, Tobergte DR, Curtis S, Organización Panamericana de la Salud. *Chlamydia* and *Chlamydiales*: more than meets the eye. J Chem Inf Model [Internet]. 2013 Jul 31 [cited 2016 May 27];53(9):425. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10889402>
20. Zapata CFL. Avifauna de la Universidad de Antioquia: aves y pájaros de Ciudad Universitaria [Internet]. Universidad de Antioquia; 2006 [cited 2016 May 4]. 124 p. Available from: <https://books.google.com/books?id=RnaFa5861RgC&pgis=1>
21. Monsalve S, Miranda J, Mattar S. Primera evidencia de circulación de *Chlamydophila psittaci* en Colombia: posible riesgo de salud pública. Rev Salud Pública. 2011;13(2):314–26.
22. Telfer BL, Moberley SA, Hort KP, Branley JM, Dwyer DE, Muscatello DJ, et al. Probable psittacosis outbreak linked to wild birds. Emerg Infect Dis

[Internet]. 2005 Mar;11(3):391–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15757553>

23. Pattison M. Poultry Diseases [Internet]. Elsevier Health Sciences; 2008 [cited 2016 Apr 11]. 611 p. Available from: <https://books.google.com/books?id=QN0h7-MGKy8C&pgis=1>
24. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;
25. Cortazar A, Elsa SR. MÉTODOS FÍSICO-QUÍMICOS EN BIOTECNOLOGIA - PCR. 2004;
26. Bolivar AM, Rojas A, Garcia-Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. *Av en Biomed*. 2014;3(1):25–33.
27. Martínez C, Silva E. Metodos fisico quimicas en biotecnologia. *Anal Chem*. 2004;
28. Rodríguez Sánchez IP, Barrera Saldaña H a. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. *Cienc UANL [Internet]*. 2004;VII:323–35. Available from: <http://eprints.uanl.mx/1584/>
29. Sandiford BR. Diagnostic Bacteriology. *Br Med J*. 2017;2(4209):359.
30. L TDD, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reaccion en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnol en salud*. 2013;
31. Fierro FF. Electroforesis de ADN. *Herramientas Mol Apl en Ecol Asp teóricos y prácticos*. 2014;27–52.
32. Khan Academy. Electroforesis en gel | Khan Academy [Internet]. 2014. Available from: <https://es.khanacademy.org/science/biology/biotech-dna-technology/dna-sequencing-pcr-electrophoresis/a/gel-electrophoresis>

33. Corporacion autonoma regional de Risaralda, Ambientales D de R, Biofísicos A. Pereira Risaralda. In pereira; p. 62.
34. Hewinson RG, Griffiths PC, Bevan BJ, Kirwan SE, Field ME, Woodward MJ, et al. Detection of Chlamydia psittaci DNA in avian clinical samples by polymerase chain reaction. Vet Microbiol [Internet]. 1997 Feb;54(2):155–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9057259>
35. Pérez-Acosta J, Martínez-Porchas M, Gollas-Galván T, Martínez-Córdova LR, Gutiérrez-Millán LE, López-Torres M. Proteínas transmembranales de organismos tipo rickettsia (OTR) en animales acuáticos: Factores de adherencia, invasión e infección. Rev Biol Mar Oceanogr. 2017;52(1):19–32.